

不同施肥对农田黑土微生物群落的影响

白 震^{1,3}, 张 明⁴, 宋斗妍^{1,3}, 张旭东^{1,2,*}

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016; 2. 辽宁沈阳农田生态系统国家野外研究站, 沈阳 110016;
3. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 4. 辽宁大学生命科学学院, 沈阳 110036)

摘要:以未施肥(CK)和休闲(Fallow)处理为对照,研究黑土肥料定位站 NP、NPK、MCK(有机肥)、MNP(有机肥+氮磷)、MNPK(有机肥+氮磷钾)等长期有机、无机肥施用对土壤基本理化性质、磷脂脂肪酸(PLFA)、酸(碱)性磷酸酶、微生物量碳或氮(SMB_C或 SMB_N)等影响。结果表明,有机肥施用有效地提高了土壤有机质、总氮及速效氮、磷、钾等养分含量,显著地增加了 SMB_C(SMB_N)和真菌、细菌的 PLFA 含量以及磷酸酶活力,极大地提高了土壤真菌/细菌比值;而长期 NP 或 NPK 处理不但未明显改善土壤养分状况,甚至抑制了磷酸酶活性及大多数菌群生长。总细菌 PLFA 与饱和脂肪酸或单烯脂肪酸与环化脂肪酸之间呈显著正相关($p < 0.01$)。PLFA 主成分分析表明,有机肥与化肥处理微生物群落结构显著不同;个别 PLFA 载荷值分析表明,真菌脂肪酸易受无机肥施用影响,而 G⁻菌或 G⁺菌脂肪酸更易受有机肥影响。休闲处理高水平微生物活性与生物量的主要贡献者是黑土细菌群落而不是真菌。

关键词:磷脂脂肪酸;酸(碱)性磷酸酶;土壤微生物;施肥;农田黑土

文章编号:1000-0933(2008)07-3244-10 中图分类号:S154.36 文献标识码:A

Effect of different fertilization on microbial community in an arable mollisol

BAI Zhen^{1,3}, ZHANG Ming⁴, SONG Dou-Yan^{1,3}, ZHANG Xu-Dong^{1,2,*}

1 Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China

2 National Research Station of Shenyang Agroecology, Shenyang 110016, China

3 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

4 Biology College of Liaoning University, Shenyang 110036, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(7): 3244 ~ 3253.

Abstract: The effects of long-term application of NP, NPK, pig manure (MCK), pig manure plus NP (MNP) and pig manure plus NPK (MNPK) on the microbial communities in a Chinese Mollisol were investigated by the determination of soil basic prosperities, phospholipids fatty acid (PLFA), acid and alkaline phosphatase activities, and microbial biomass C (SMB_C) or N (SMB_N). The nil-fertilizer treatment (CK) and fallow plots were utilized as controls. The results showed that the application of pig manure significantly increased the amounts of soil organic matter (SOM), total nitrogen (TN), available phosphorus (AP), alkali-hydrolysable nitrogen (AN), and readily available potassium (RAK). Furthermore, the SMB_C or SMB_N, ACPase or ALPase activities, fungal or bacterial PLFA contents, and fungal-to-bacterial PLFA ratios in the manure treatments were all higher than those in CK or the chemical fertilizer treatments. Long-term application of NP or NPK had inhibited the two phosphatase activities and the growth of most microorganisms. The relationship between

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(40535028);中国科学院知识创新工程重要方向资助项目(KZCX3-SW-433)

收稿日期:2007-06-18; **修订日期:**2008-03-17

作者简介:白震(1975~),男,辽宁沈阳人,博士生,主要从事土壤微生物学研究, E-mail: baizhen@iae.ac.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xdzhang@iae.ac.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 40535028); Knowledge Innovation Project of CAS (No. KZCX3-SW-433)

Received date: 2007-06-18; **Accepted date:** 2008-03-17

Biography: BAI Zhen, Ph. D. candidate, mainly engaged in soil microbiology. E-mail: baizhen@iae.ac.cn

monounsaturated fatty acids (MONO) and cyclopropyl fatty acids (CYCLO) or between normal saturated fatty acids (NSAT) and total bacterial PLFAs was positively correlated at 0.01 levels. PCA of PLFA showed that manure and chemical fertilizers affected microbial community structure in different ways. The loading values for the individual PLFA indicated that fungal 18:2 ω 6,9 was significantly affected by chemical fertilizers application, while the ones of G⁻ or G⁺ were affected by organic manure amendment. The higher levels of microbial activities and biomass in the fallow treatment compared with the other treatments were mainly attributed to soil bacterial groups rather than fungal ones.

Key Words: phospholipids fatty acid (PLFA); acid (alkaline) phosphatase; soil microorganism; fertilization; mollisol farmland

土壤微生物对外源底物竞争会驱动微生物群落结构及相应养分矿化固持过程发生改变^[1,2]。事实上,土壤微生物繁殖迅速、代谢速率极快,如土壤微生物量氮转化速率是植物残体 10 倍^[3],这使得微生物生态生理特征对养分、水热等农田土壤环境条件变化的响应速度超过有机碳或全氮等其它常规养分指标^[4];微生物量、酶活性及群落结构特征等对土壤养分盈亏等环境胁迫的耐受力具有明显种群特征^[5]。因此,土壤微生物具有定义土壤生态系统过程和整合物理、化学、生物学特性的效用,可揭示与养分循环转化过程相关的土壤功能。磷脂脂肪酸(Phospholipids fatty acid, PLFA)已被广泛应用于原位土壤活体微生物群落研究^[6~8],且各菌群 PLFA 组成差异显著^[9~11]。例如,18:2 ω 6,9 常见于真菌,细菌多含有 i15:0, a15:0, 15:0, 16:1 ω 9, 17:0, cy17:0, cy19:0 等^[12~16]。氯仿熏蒸法测定的微生物量碳或氮(SMB_C或 SMB_N)与土壤酸(碱)性磷酸酶(ACPase or ALPase)则可反映土壤微生物量及活力的总体水平^[17]。

自然选择会使资源效用最大化,而土壤肥力质量演变又是一个相对缓慢的过程^[18,19]。因此,长期肥料定位试验可以积累短期试验无法得到的主导特定养分高效代谢周转过程的原位土壤微生物群落特征^[20,21]。化肥与有机肥合理(平衡)配施可以提高土壤肥力是已被广泛接受的事实:英国洛桑站连续百余年适量氮磷钾肥配施可保证作物持续高产且土壤肥力没有下降^[22];土壤有机质(SOM)是微生物矿化固持过程的核心驱动力,保持或增加农田 SOM 需要持续输入植物残体、腐肥、厩泥等有机物料^[23]。然而,土壤微生物群落对外源养分响应规律的研究结果不完全一致。例如,尽管 37a 不同氮磷处理可改变 PO₄-P、NO₃-N、C_{sol-ext} 含量,但并未影响总 PLFA 量^[24];虽然施用 NH₄HCO₃ 土壤中微生物量碳(SMB_C)增加,但其 DNA 多样性却显著减少^[25];Parham 等^[18]认为牛粪会促进土壤细菌生长但对真菌生长不利,而 Yeates^[26]等认为有机肥促进真菌生长。

东北黑土区素有“谷物粮仓”之称,每年向国家交售商品粮占全国总量 1/3。但是,近几十年高强度耕作严重恶化农田黑土物理、化学及生物学特性,最突出表现是 SOM 含量大幅下降,抗逆性和缓冲性减弱,易旱、易涝、易脱肥以及作物养分失衡等现象频繁发生^[27]。目前,我国农田黑土研究尚停留在土壤养分对作物有效性^[28]、能量流动^[29]、耕作方式^[30]、微生物量及土壤酶活变化^[31]等方面,而对评价土壤肥力质量演变、保证黑土碳氮磷等必要养分可持续利用极为关键的土壤微生物群落生态生理特征却知之甚少。采集公主岭国家级黑土长期肥料监测站 7 个施肥处理土壤样品,测定 PLFA、SMB_C或 SMB_N以及酸(碱)性磷酸酶活力,研究土壤各微生物群落结构、活力对不同施肥处理响应规律,为保持土壤肥力、提高作物产量、实现低耗高效农业提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计与处理

公主岭(东经 124°48'33",北纬 43°30'23")国家黑土长期肥料试验始于 1980 年,至今保持了相同处理和玉米单作制度(田间肥料试验未设重复)。化肥用量:氮,150 kg/(hm²·a),尿素;磷,32.73 kg/(hm²·a),重过磷酸钙;钾,62.27 kg/(hm²·a)有机肥用量:有机质(OM),4.5 t/(hm²·a),猪粪。4 月下旬施底肥,6 月下旬追肥:氮肥 1/3 为底肥,2/3 追施;磷肥全部做底肥;有机肥于上一年初秋收获后一次性施用。于 2006 年 9 月 25

日采集 0~20 cm 耕层土壤,每个施肥处理均分 3 个小区,并于每个小区按蛇形方式取五点混匀后备用。选取施肥处理如下:氮-磷肥配施(NP)、氮-磷-钾肥配施(NPK)、单施有机肥(MCK)、有机肥-氮-磷肥配施(MNP)、有机肥-氮-磷-钾肥配施(MNPK)、未施肥(CK)和休闲处理(Fallow)为对照。

1.2 测定方法

鲜土于 24 h 内去除植物残体、过 2 mm 筛,立即用氯仿熏蒸浸提法测定 SMB_c (SMB_N);部分鲜土 4 °C 下保存并于一周内用对硝基苯磷酸盐法测定酸性磷酸酶(ACPase)或碱性磷酸酶(ALPase);部分鲜土冻干保存用于磷脂分析;其余土壤风干后测定下列基本理化性质:水浸提法测 pH 值,土壤有机碳用于烧法测定(TOC-5000A, Total organic carbon analyzer, SHIMADZU)(OM 以 1.724 倍总有机碳计),消煮法测总氮(TN),速效钾(RAK)采用中性 1 mol/L 乙酸铵浸提火焰光度计法测定,有效磷(AP)采用 Olsen 法(碳酸氢钠提取钼锑抗比色紫外吸收)测定,碱解氮(AN)用碱解扩散法(还原剂为硫酸亚铁)测定^[17]。PLFA 提取参照 Bligh-Dyer 修正方法^[32],酯化 C19:0 为内标,用 Agilent 6890 气相色谱仪(GC)测定。色谱条件:HP-5 柱(30.0 m × 320 μm × 0.25 μm),进样量 1 μl,分流比 10:1,载气(N₂)流速 0.8 ml/min。初始温度 140 °C 维持 3 min,分 3 个阶段程序性升温:140~190 °C, 4 °C/min,保持 1 min;190~230 °C, 3 °C/min,保持 1 min;230~300 °C, 10 °C/min,保持 2 min。火焰离子检测器(FID)检测。峰面积通过计算机自动积分,各脂肪酸的识别与定量分别参照 BAME(bacterial acid methyl esters) Mix 和 Supelco 37 Component FAME Mix。真菌以多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, POLY)18:2ω6,9c 指示;以 i15:0、a15:0、15:0、i16:0、16:1ω9、i17:0、cy17:0 等作为总细菌源脂肪酸(total Bacterial PLFA, tot Bac),这里亦用饱和脂肪酸(normal saturated fatty acids, NSAT)14:0、15:0、16:0、17:0、18:0 之和辅助指示细菌生物量;G⁺ 以 i15:0、a15:0、i16:0、i17:0 等支链脂肪酸(terminally branched saturated fatty acids, TBSAT)表示;G⁻ 以 16:1ω9、18:1ω9t、18:1ω9c 等单烯不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acids, MONO)或环化脂肪酸(cyclopropyl fatty acids, CYCLO)cy17:0 表示;微生物群落总量(total PLFA, totPLFA)以各脂肪酸加和表示^[12~16,33]。

1.3 数据分析

利用 SPSS 13.0 处理数据,单因素方差分析 S-N-K 法计算检验差异显著性(3 次重复)。柱形图上方的英文字母代表数据之间差异的显著程度, $p < 0.05$ 。主成分分析具体指标为:旋转方法采用 Varimax 法,最大迭代步数为 25;公因子提取采用主成分分析法;KMO 与球形假设检验均表明各变量适合因子分析。

2 结果与分析

2.1 施肥对土壤基本理化性质的影响

与 CK 或休闲处理相比,各有机肥处理土壤 pH 明显降低,而 NP 或 NPK 处理 pH 无显著变化。有机肥显著提高 OM、TN、AN、AP、RAK 含量,以 AP 增加最为明显;NP 或 NPK 处理仅 AP 或 RAK 含量略有升高。休闲处理中,除 OM 略低外,其它养分均显著高于 CK(表 1)。

表 1 土壤基本理化性质
Table 1 Basic characteristics of soil

处理 Treatments	pH	有机质 Organic matter (g/kg)	总氮 Total Nitrogen (g/kg)	碱解氮 Alkalytic N (mg/kg)	有效磷 Available P (mg/kg)	速效钾 Readily available K (mg/kg)
休闲 Fallow	8.04	27.6 e	1.09 c	95.28 d	7.00 d	174.49
CK	8.19	31.3 d	0.97 d	85.84 e	4.32 d	128.34
NP	8.06	30.8 d	1.06 c	91.95 d	8.29 d	128.34
NPK	8.12	31.7 d	0.97 d	96.39 d	13.18 d	146.80
MCK	7.89	43.8 b	1.73 b	128.06 c	112.28 c	183.72
MNP	7.61	45.3 a	2.16 a	142.50 a	219.89 a	211.41
MNPK	7.76	40.0 c	1.70 b	138.06 b	144.72 b	229.87

2.2 不同施肥处理土壤微生物量与活力

与 CK 处理相比,有机肥施用显著促进土壤微生物生长(图 1):就 SMB_C 而言, $MNPK(258.6 \text{ mg/kg}) > MNP(243.3 \text{ mg/kg}) > MCK(208.6 \text{ mg/kg})$; SMB_N 以 MCK 处理(57.5 mg/kg)最高, $MNP(49.7 \text{ mg/kg})$ 与 $MNPK(46.9 \text{ mg/kg})$ 无显著差异。各化肥处理土壤 SMB 变化相似, CK(160.8 mg/kg) 处理 SMB_C 低于 NPK 处理(196.8 mg/kg), 而 NP 处理(79.4 mg/kg) 最低; SMB_N 规律亦同, 即 NPK(40.2 mg/kg) 与 CK(38.1 mg/kg) 高于 NP(28.8 mg/kg)。尽管休闲处理土壤养分含量显著小于有机肥各处理, 但其 SMB_C (381.2 mg/kg) 与 SMB_N (56.5 mg/kg) 最高。 SMB_C/SMB_N 比值结果表明, 休闲处理最高(6.76), $MNPK(5.51)$ 、 $MNP(4.92)$ 与 NPK (4.91) 次之, CK(4.22) > MCK(3.64), NP 处理(2.76) 最低。

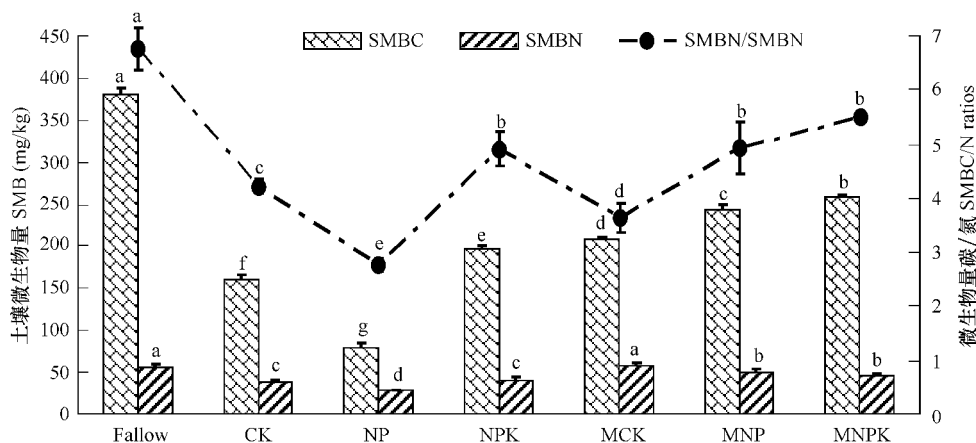


图 1 不同施肥处理土壤微生物量碳氮

Fig. 1 Soil microbial biomass in different treatments

ALPase 或 ACPase 活力显著受有机肥促进(图 2): ALPase 在 MNP 处理达 $405.8 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$, $MNPK(367.0 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h}))$ 与 MCK 处理($365.1 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h}))$ 次之; ACPase 最高值在 MNP($172.4 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h}))$ 处理, MCK($146.8 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h}))$ 及 MNPK 处理($138.9 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h}))$ 次之。NP 或 NPK 处理以相同方式显著抑制两种磷酸酶活力: 如 ALPase 活力在 NPK ($258.4 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$) 或 NP($252.1 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$) 处理中显著低于 CK ($323.1 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$)。休闲处理 ALPase ($514.3 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$) 和 ACPase ($150.7 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$) 高于多数有机肥处理, 再次显示了该处理极高土壤微生物活力水平。

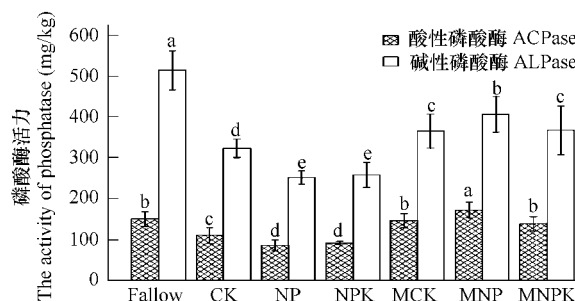


图 2 不同施肥处理土壤磷酸酶活力

Fig. 2 Phosphatase activities in different treatments

2.3 不同施肥处理土壤微生物群落结构

总土壤活体微生物量($totPLFA$)、总细菌生物量($totBac PLFA$)及真菌生物量($Fun PLFA$)在各处理变化规律极为相近, 即有机肥施用显著促进各菌群生长, 而 NP 或 NPK 处理抑制土壤微生物生长(图 3)。以 $totPLFA$ 为例, $MCK(133.2 \text{ nmol/g})$ 、 $MNP(133.1 \text{ nmol/g})$ 和 $MNPK(127.4 \text{ nmol/g})$ 处理显著高于 CK(107.0 nmol/g) 与 NPK(103.3 nmol/g), 而 NP(86.0 nmol/g) 处理最低。休闲处理 $totPLFA$ (164.1 nmol/g) 与 $totBac PLFA$ (59.3 nmol/g) 显著高于有机肥等处理, 而 POLY(9.4 nmol/g) 则介于有机肥与无机肥处理之间。真/细菌比值($POLY/totBac PLFA$)结果表明, 有机肥显著高于休闲和化肥处理, 即 $MNP(0.279) > MCK(0.258) > MNPK(0.233) > 休闲(0.159) > CK(0.133) > NPK(0.086)$ 或 NP(0.077) 处理。

不同施肥处理各细菌菌群变化规律相似, 即最高值出现在休闲处理, 有机肥处理次之, CK 与 NPK 处理接

近且较低,最低值均在 NP 处理(图 4)。例如,MONO 于休闲处理(53.9 nmol/g)最高,MCK(32.7 nmol/g)、MNP(31.3 nmol/g)、MNPK(29.9 nmol/g)、CK(28.8 nmol/g)、NPK(28.3 nmol/g)等处理间无显著差异,NP(20.9 nmol/g)处理最低。CYCLO 也以休闲处理最高(6.64 nmol/g),有机肥各处理间(5.58~6.02 nmol/g)或化肥各处理间(4.02~4.50 nmol/g)无显著差异。TBSAT 及 NSAT 变化规律亦极为相似。

TBSAT 在 G^+ 中所占比例极高,可指示 G^+ 菌群生物量;而 MONO 或 CYCLO 则常见于 G^- 菌群中;NSAT 可代表总细菌生物量^[9~13,16]。因此,TBSAT/MONO、TBSAT/CYCLO 以及 MONO/NSAT 等比值可指示细菌

群落结构变化规律。研究表明,TBSAT/MONO 与 TBSAT/CYCLO 变化规律较为接近,如 TBSAT/MONO 以 NP 处理最高(1.097),MNPK(0.925) > MNP(0.904) > MCK(0.839) 处理,CK(0.861) 与 NPK 处理(0.877) 无显著差异且明显高于休闲处理(0.643);TBSAT/CYCLO 亦在 NP 处理最高(5.70),而 MNPK(4.97)、MNP(4.71)及 MCK(4.65)处理依次降低,CK(5.67)与 NPK(5.52)略高于休闲(5.22)。 G^+/G^- 与 MONO/NSAT 比值变化规律完全相反,后者在休闲处理最高(0.909),NP 处理接近最低值(0.592);各有机肥处理中,MCK(0.603)略高于 MNP(0.588),而 MNPK(0.564)处理该比值最低(图 4)。

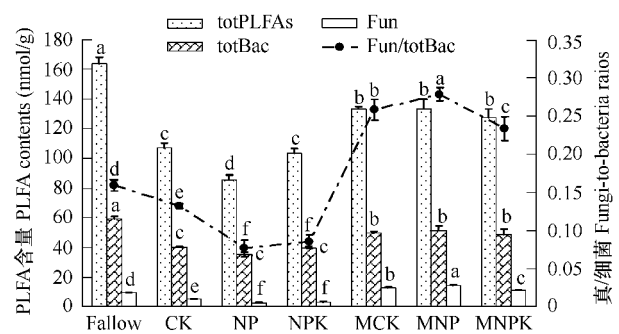


图 3 不同施肥处理土壤真、细菌及总微生物 PLFA 含量

Fig. 3 Contents of fungi, bacteria and total biomass PLFA in different treatments

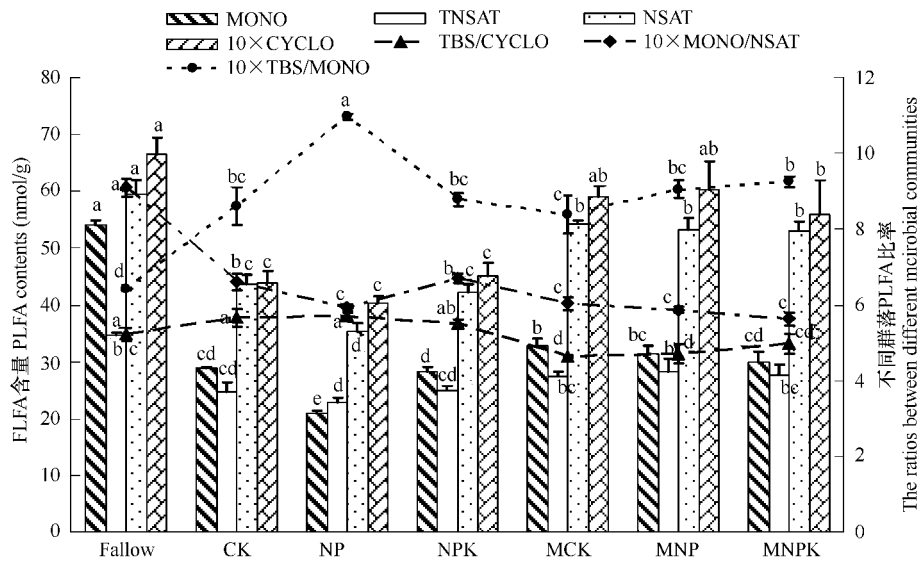


图 4 不同施肥处理细菌 PLFA 含量

Fig. 4 Bacterial PLFA contents in different treatments

PLFA 主成分分析(PCA)表明,未施有机肥处理对第一主成分(PC1)贡献较大,以休闲处理最突出(变量系数=0.822),NPK、NP 及 CK 处理变量系数也在 0.76 以上;有机肥处理对 PC2 贡献较大,各变量系数 > 0.79(图 5a)。个别 PLFA 载荷值结果表明(图 5b),真菌 18:2 ω 6,9、细菌 18:0,16:1 ω 9,14:0 及 15:0 等脂肪酸对 PC1 贡献较大,各变量系数均大于 0.9,受化肥或休闲处理影响显著;而 G^+ 菌 a15:0 及 G^- 菌 18:1 ω 9c、18:1 ω 9t 对 PC2 贡献最大,各变量系数 > 0.9,受有机肥施用显著影响。

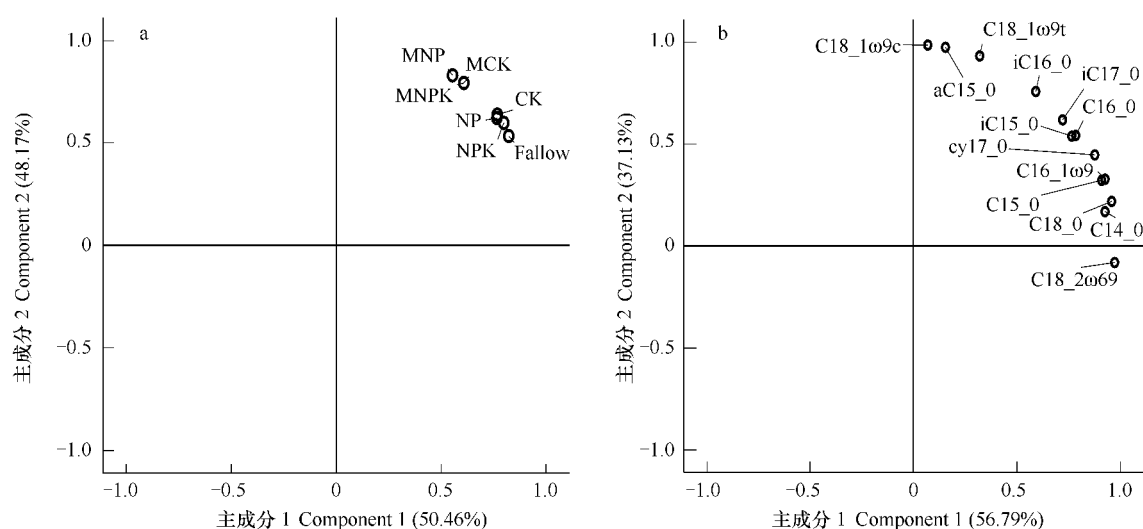


图5 不同施肥处理及个别脂肪酸载荷值主成分分析

Fig. 5 Principal component analysis of PLFA showing score plots for the different treatments and loading values for the individual PLFA

3 讨论与结论

3.1 讨论

与单施化肥处理相比,长期施用有机肥显著改善农田黑土基本理化性质(表1);土壤微生物活力与结构也呈现相同变化趋势。Böhme 等^[33]与 Peacock 等^[34]认为,施用有机肥可促进活性有机碳积累,进而提高 SMB、改善土壤微生物群落结构及其生态功能。本研究结果表明,有机肥处理 SMB_c或 SMB_N含量分别是 CK 处理的 1.3~1.6 倍或 1.2~1.5 倍;但 NPK 处理 SMB 与 CK 无显著差异,而 NP 处理甚至有所下降。化肥处理 SMB_c或 SMB_N显著下降可能与化肥中有毒金属污染物常年积累有关^[35]。不同菌群 SMB_c/SMB_N比例明显不同,如真、细菌 C/N 比值之比约 10:4^[9,36]。因此,整个土壤微生物群落 C/N 比值变化可反映土壤各菌群(如真菌与细菌)生物量相对变化,进而说明不同养分状况下微生物群落响应规律。研究表明,各施肥处理 SMB_c/SMB_N比值与 CK 差异不显著,MCK 与 NP 处理略低。显然,由于 SMB_c(SMB_N)代表了土壤总微生物群落生物量,而土壤微生物种类多样、结构复杂,因此,以 SMB_c/SMB_N比值反映土壤微生物群落结构变化尚存不足之处。

ACPase 或 ALPase 可催化有机磷酸酯和酸酐(如 β-甘油磷酸,酚磷酸盐等)水解,促进土壤有机磷矿化从而为植物提供必要磷素,因此是极重要的土壤酶^[37,38]。本研究显示,各有机肥处理两种磷酸酶活力是 CK 处理 1.3 倍左右,与 SMB_c(SMB_N)增长量相当。正如 Böhme 等^[33]研究表明,有机肥处理中大量活性碳源输入可促进 SMB 与 ALPase 活力显著增加,这也证明 ACPase 或 ALPase 是微生物源。Marschner 等^[39]发现,单施低量有机肥(5.2 t/(hm²·a))与 NPK 处理之间 ALPase 活力无显著差异;而本研究则表明,MCK 处理 ACPase 或 ALPase 活力分别是 NPK 处理的 1.6 倍或 1.4 倍。上述差异可能与土壤质地、有机肥用量等因素不同有关。NP 或 NPK 处理磷酸酶活力均显著低于 CK 处理,可能与磷酸酶受无机磷肥反馈抑制有关^[37]。

Hamel 等^[24]PLFA 分析结果表明,尽管土壤特性(如土壤水势,土壤 PO₄-P, NO₃-N, C_{sol-ext})有一定改变,但 37 年不同氮磷等化肥配施处理不影响土壤总 PLFA 含量。本研究也证明,长期 NP 或 NPK 施用未显著促进黑土各菌群生长。

一般认为,高真/细菌比值表明农田土壤生态系统更为持续稳定^[36]。这主要是因为:(1)真菌菌丝体可以允许真菌运动、寄居并降解土壤表面动、植物残体,而细菌则无法实现这种功能;(2)真菌化学成分更为复杂,如真菌细胞壁中存在黑色素与几丁质的多聚物;(3)细菌对碳源同化效率相对较低,如真菌贮存废叶源碳量是细菌 26 倍。因此,通过真菌生物量固定的碳有较高可持续性且难于很快降解;而细菌生物量固定的碳则易

于发生变化;利于真菌生长的土壤特性,有利于土壤碳贮量提高^[16]。本研究结果显示,有机肥处理真菌/细菌比值远高于休闲、化肥或 CK 处理。显然,有机肥施用有利于农田黑土有机质积累。

MONO 与 CYCLO 均被认为是 G^- 菌重要生物标记物^[40,41],随着有机质含量与高底物利用性提高而增加^[13,42]。这里对 MONO 与 CYCLO 进行相关分析,结果表明二者极显著正相关($r=0.782, p < 0.01$,图 6a)。Böhme 等^[33]研究发现,施用粪肥(FYM)的不同土壤类型中,MONO 含量高于化肥处理或对照。Peacock 等^[34]研究表明,低(252 kg N hm^{-2})或高量(504 kg N hm^{-2})有机肥处理 G^- PLFA 比 CK 高 15 或 27%;土壤假单胞菌等 G^- 菌对外源有机质竞争力较强,因此,有机肥处理大量可溶性底物有机碳输入有利于以单不饱和脂肪酸为特征的 G^- 菌群积累。本研究表明,MCK 处理 MONO 含量比 CK 高约 14%(图 4),显然有机肥施用确实显著促进 G^- 菌生长。与 CK 相比,NP 处理不利于 G^- 菌生长,正如 Peacock 等^[34]研究表明,硝酸铵(218 kg N hm^{-2})处理 G^- PLFA 比 CK 低 15%。

NSAT 被认为是细菌群落有效标识物^[33],这里对 NSAT 与总细菌 PLFA 作相关分析,发现二者极显著正相关($r=0.967, p < 0.01$,图 6b)。Zelles 等^[13]发现,NPK 处理 MONO 与 NSAT 接近,而有机肥-化肥配施处理中 MONO 远高于 NSAT。本研究中二者变化趋势有所不同,表现为各施肥(除休闲)处理中 NSAT 均显著高于 MONO(图 4)。Zelles 等^[13,43]认为,单不饱和脂肪酸浓度是揭示土壤微生物生理状态的重要信息,MONO/NSAT 比值可评估微生物群落与环境条件;通常,碳源含量较高或有机质输入较多的耕作土壤 MONO/NSAT 比值 >1 。Böhme 等^[33]发现,不同类型农田土壤有机肥、化肥及对照处理 MONO/NSAT 比值介于 $1.09 \sim 1.89$ 。本研究中,各施肥处理 MONO/NSAT 比值 <1 (图 4),有机肥处理与化肥处理之间无显著差异,只是休闲处理该比值显著高于其它处理。上述差异可能与土壤样品采集季节、作物生长时期等因素有关。

TBSAT 为多数 G^+ 菌所特有,因此 TBSAT/MONO 比值可表示 G^+/G^- 菌比例变化。Kieft 等^[44]认为,节杆菌等 G^+ 为对饥饿条件适应能力极强,而假单胞菌等 G^- 菌对环境胁迫的适应力则相对较差。然而,并非所有养分充足环境中 G^+/G^- 比值均会显著下降。例如,Marschner 等^[39]利用 PLFA 技术研究发现,单施有机肥($5.2 \text{ t} / (\text{hm}^2 \cdot \text{a})$)处理 G^+/G^- 及细菌/真菌(脂肪酸)比值高于 NPK 处理。显然,菌群对施肥处理的响应受地域间差异的影响较为强烈。本研究中,各施肥处理 G^+/G^- 比值较为一致,仅休闲处理略低于其它处理。

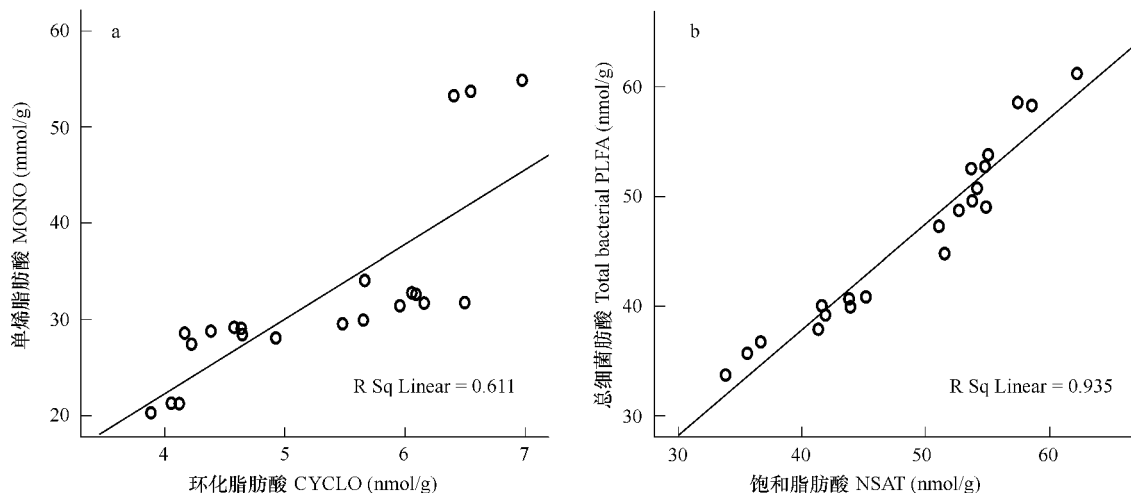


图 6 特定菌群 PLFA 含量相关分析

Fig. 6 PLFA contents correlation analysis between different specific microbial groups

Böhme 等^[33] PLFA 的主成分分析表明,Keszthely 肥料试验站有机肥与 NPK 处理分异明显,18:1 ω 9c 等 MONO 脂肪酸受有机肥施用影响显著;而 18:2 ω 6,9 受化肥施用影响显著。Peacock 等^[34] PLFA 的 PCA 结果表明,有机肥施用显著影响 18:1 ω 9c 含量,有机肥可携带大量稳定、易于降解碳源底物供土壤微生物群落利用。NP 或 NPK 处理与 CK 或休闲处理菌群结构相近,对真菌 POLY 影响显著;而有机肥施用显著改变菌群结

构,尤其对 18:1 ω 9 t(c)影响较为强烈。

尽管休闲处理土壤养分含量与各化肥处理相当、远低于有机肥处理(表 1),但其 SMB_c(SMB_N)、磷酸酶活力测定结果却显示,该处理 SMB_c 与 ALP_{ase}活力显著高于有机肥处理(图 1,图 2)。其原因可能是休闲处理较少农业翻耕、机械破碎可保留真菌菌丝体结构完整性,使其生物量可持续稳定增长;同时,极少的农业措施的干预,可能保留黑土区特有土壤生态系统和微生物群落结构的高丰富度与均匀性。休闲处理微生物群落结构特殊性也可通过 PLFA 测定结果来验证。例如,休闲处理土壤总 PLFA、G⁺或 G⁻菌等各细菌群落 PLFA 含量显著高于有机肥等处理(图 3,图 4),而真菌(POLY)PLFA 含量则显著低于有机肥处理而显著高于化肥处理(图 3)。上述结果一方面说明,休闲处理极高微生物量与活力主要是由细菌群落贡献;另一方面也表明,长期高强度农业耕作措施—无论是施用有机肥或是仅施用化肥处理,可能会在一定程度上抑制黑土细菌群落生长与活力。

3.2 结论

长期有机肥施用显著提高农田黑土 SOM 等养分含量,改善土壤微生物生存环境,促进各菌群生长与活力;NP、NPK 处理不但未显著提升土壤养分水平,甚至对微生物群落起到一定抑制作用。有机肥施用显著促进真、细菌 PLFA 含量增长,尤其促进了土壤真菌/细菌比值提高,显示了有机肥处理更有利于以高量有机质为特征的健康良性生态系统的形成。

有机肥处理下黑土微生物群落结构发生明显变化,在 PLFA 的 PCA 图上可清楚地将有机肥与无机肥处理分开;有机肥主要影响 G⁺菌 a15:0、G⁻菌 18:1 ω 9c、18:1 ω 9c 含量,而真菌 18:2 ω 6,9 更易受化肥施用的影响。

休闲处理微生物量水平与活力显著高于部分有机肥或所有化肥处理,其原因可能在于较少农业翻耕等人为了干预更利于维持细菌群落多样性与均匀性。

农田黑土 MONO 与 CYCLO 或 NSAT 与总细菌 PLFA 极显著正相关说明,G⁻菌可分别用 MONO 或 CYCLO 表示;而黑土细菌群落则完全可以用 NSAT 含量变化来指示。

References:

- [1] Lovell R D, Hatch D J. Stimulation of microbial activity following spring applications of nitrogen. *Biol. Fertil. Soils*, 1998, 26: 28—30.
- [2] Clegg C D, Lovell R D L, Hobbs P J. The impact of grassland management regime on the community structure of selected bacterial groups in soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2003, 43: 263—270.
- [3] Lovell R D, Jarvis S C, Bardgett R D. Soil microbial biomass and activity in long-term grassland: effects of management change. *Soil Biology and Biochemistry*, 1995, 27: 969—975.
- [4] Doran J W, Zeiss M R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, 2000, 15: 3—11.
- [5] Anderson T H. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2003, 98: 285—293.
- [6] Vestal J R, White D C. Lipid Analysis in Microbial Ecology. *Bioscience*, 1989, 39(8): 535—541.
- [7] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and Lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils*, 1999, 29: 111—129.
- [8] Hill T C J, McPherson E F, Harris J A, *et al.* Microbial biomass estimated by phospholipid phosphate in soils with diverse microbial communities. *Soil Biol. Biochem.*, 1993, 25(12): 1779—1786.
- [9] Bååth E, Anderson T H. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35(7): 955—963.
- [10] Keinänen M M, Korhonen L K, Lehtola M J, *et al.* The microbial community structure of drinking water biofilms can be affected by phosphorus availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(1): 434—439.
- [11] Sundh I, Borgå P, Nilsson M, *et al.* Estimation of cell numbers of methanotrophic bacteria in boreal peatlands based on analysis of specific phospholipid fatty acids. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 18(2): 103—112.
- [12] Ringelberg D B, Sutton S, White D C. Biomass, bioactivity and biodiversity: microbial ecology of the deep subsurface: analysis of ester-linked phospholipid fatty acids. *FEMS Microbiology Review*, 1997, 20(3-4): 371—377.
- [13] Zelles L, Bai QY, Beck T, *et al.* Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community

- structure in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1992, 24 (4) :317—323.
- [14] Richard D B, Walkerb L R. The measurement of soil fungal:bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. *Biol Fertil Soil*, 1999, 29(3) :282—290.
- [15] Olsson P A, Thingstrup I, Jakobsen I, *et al.* Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31(13) :1 879—1 887.
- [16] Bailey V L, Smith J L, Bolton H Jr. Fungal-to-bacterial ratios in soils investigated for enhanced C sequestration. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, 34(7) :997—1 007.
- [17] Lu R K. Chinese Soil Society. ed. *The chemical analysis in the agricultural soil*. Beijing: Chinese Agricultural Technology Press, 1999.
- [18] Parham J A, Deng S P, Da H N, *et al.* Long-term cattle manure application in soil II. Effect on soil microbial populations and community structure. *Biol Fertil Soils*, 2003, 38:209—215.
- [19] Stark C, Condon L M, Stewart A, *et al.* Influence of organic and mineral amendments on microbial soil properties and processes. *Applied Soil Ecology*. *Applied Soil Ecology*, 2007, 35:79—93.
- [20] Dilly O, Bloem J, Vos A, *et al.* Bacterial Diversity in Agricultural Soils during Litter Decomposition. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1) :468—474.
- [21] Widmer F, Rasche F, Hartmann M, *et al.* Community structures and substrate utilization of bacteria in soils from organic and conventional farming systems of the DOK long-term field experiment. *Applied Soil Ecology*, 2006, 33(3) :294—307.
- [22] Jin J Y, Wu R G. The protection and utilization of fertilization and tillage resources. *Theses of symposium for fertilization and environment*. Beijing: Chinese Agricultural Science Publishing Company, 1999. 75—84.
- [23] Fontaine S, Mariotti A, Abbadie L. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35: 837—843.
- [24] Hamel C, Hanson K, Selles F, *et al.* Seasonal and long-term resource-related variations in soil microbial communities in wheat-based rotations of the Canadian prairie. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(8) :2 104—2 116.
- [25] Yang Y H, Yao J, Hu S, *et al.* Effects of agricultural chemicals on DNA sequence diversity of soil microbial community: a study with RAPD marker. *Microbial Ecology*, 2000, 39:72—79.
- [26] Yeates G W, Bardgett R D, Cook R, *et al.* Faunal and microbial diversity in three welsh grassland soils under conventional and organic management regimes. *J. Appl. Ecol.*, 1997, 34, 453—470.
- [27] Zhao L P, Wang H B, Liu H Q. Mechanism of fertility degradation of black soil in corn belt of songliao plain. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(1) : 79—84.
- [28] Wang J G, Liu H X. Study on nutrient-supply capacity of black soil and its change. *Acta Pedologica Sinica*, 1997, 34(3) :295—301.
- [29] Zhang X Y, Meng K, Zhang Z X, *et al.* Study on matter accumulation and energy flow of spring wheat population in the black soil area. *Journal of Triticeae Crops*, 2003, 23(4) :47—51.
- [30] Liu H X, Wang D L, Zhang S J, *et al.* Comparative study on the agricultural management systems in black soil region of Songhuajiang River-Nenjiang River of Northes. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1994, 5(2) :148—151.
- [31] Li D P, Chen L J, Wu J J, *et al.* Dynamics of microbial biomass N in different fertilized black soil and its related factors. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(10) :1891—1896.
- [32] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, 37(8) :911—917.
- [33] Böhme L, Langer U, Böhme F. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2005, 109:141—152.
- [34] Peacock A D, Mullen M D, Ringelberg D B, *et al.* Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications. *Soil Biol. Biochem.*, 2001, 33, 1011—1019.
- [35] Šimek M, Hopkins D W, Kalčík J, *et al.* Biological and chemical properties of arable soils affected by long-term organic and inorganic fertilizer applications. *Biol. Fertil. Soils*, 1999, 29:300—308.
- [36] Vries F T, Hoffland E, Eekeren N V, *et al.* Fungal/bacterial ratios in grasslands with contrasting nitrogen management. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(8) :2092—210.
- [37] Plaza C, Hernández D, García-Gil J C, *et al.* Microbial activity in pig slurry-amended soils under semiarid conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36:1 577—1 585.
- [38] Böhme L, Böhme F. Soil microbiological and biochemical properties affected by plant growth and different long-term fertilization. *European Journal of Soil Biology*, 2006, 42:1—12.

- [39] Marschner P, Kandeler E, Marschner B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35: 453 – 461.
- [40] Frotegard Å, Bååth E, Tunlid A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol. Biochem.*, 1993, 25(6): 723 – 732.
- [41] Pankhurst C E, Yu S, Hawke B G, *et al.* Capacity of fatty acid profiles and substrate utilization patterns to describe differences in soil microbial communities associated with increased salinity or alkalinity at three locations in South Australia. *Biol. Fertil. Soil*, 2001, 33: 204 – 217.
- [42] Bossio D A, Scow K M. Impact of carbon and flooding on soil microbial communities; phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microb. Ecol.*, 1998, 35: 265 – 278.
- [43] Zelles L, Rackwitz R, Bai Q Y, *et al.* Discrimination of microbial diversity by fatty acid profiles of phospholipids and lipopolysaccharides in differently cultivated soils. *Plant and Soil*, 1995, 170, 115 – 122.
- [44] Kieft T L, Ringelberg D B, White D C. Changes in Ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(9): 3292 – 3299.

参考文献:

- [17] 鲁如坤. 中国土壤学会编. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 1999.
- [22] 金继运, 吴荣贵. 施肥与耕地资源的合理利用和保护. 施肥与环境学术讨论会论文集. 北京: 中国农业科技出版社, 1994. 75 ~ 84.
- [27] 赵兰坡, 王鸿斌, 刘会青, 等. 松辽平原玉米带黑土肥力奴化机理研究. *土壤学报*, 2006, 43(1): 79 ~ 84.
- [28] 王建国, 刘鸿翔. 黑土农田养分供应能力和变化. *土壤学报*, 1997, 34(3): 295 ~ 301.
- [29] 张兴义, 孟凯, 张志学, 等. 黑土区春小麦群体物质和能量积累研究. *麦类作物学报*, 2003, 23(4): 47 ~ 51.
- [30] 刘鸿翔, 王德禄, 张素君, 等. 松嫩平原黑土区不同养分循环结构农业经营制度比较研究. *应用生态学报*, 1994, 5(2): 148 ~ 151.
- [31] 李东坡, 陈利军, 武志杰, 等. 不同施肥黑土微生物量氮变化性及相关因素. *应用生态学报*, 2004, 15(10): 1891 ~ 1896.